

УДК 615.074

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА КОРМОВОЙ ДОБАВКИ «КУПРУМ-АКТИВ»
МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ**

Баран А.В., Фадеев В.И.

УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

*Концентрация элементов Cu, As, Cd, Pb, Hg была определена в кормовой добавке «Купрум-актив» при помощи масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС). Градуировку проводили методом внешнего стандарта по 5 точкам, с вычетом фона раствора бланка и с коррекцией супрессии по внутренним стандартам. Правильность методики подтверждена результатами контрольных испытаний, полученными для стандартного образца состава SRM 1577C. **Ключевые слова:** масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, ИСП-МС, микроволновое разложение, элементный анализ.*

**DEVELOPMENT OF THE QUALITY CONTROL METHODOLOGY OF FEED ADDITIVE "KUPRUM-ACTIVE"
BY THE MASS-SPECTROMETRY WITH AN INDUCTIVE COUPLED PLASMA**

Baran A.V., Fadeev V.I.

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

*The concentration of elements Cu, As, Cd, Pb, Hg was determined in a feed additive "Cuprum-active" using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The calibration was carried out using the external standard method by 5 points, with the background solution of the blank subtracted and with the correction of the suppression according to internal standards. The correctness of the technique is confirmed by comparing the results obtained for standard samples of the SRM 1577C product with certified values. **Keywords:** inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS, microwave decomposition, multi-element analysis.*

Введение. Обеспечение животноводства достаточным количеством минеральных веществ - приоритетное направление развития современной ветеринарной промышленности. Дефицит минерального питания является одной из главных причин, сдерживающих интенсивность откорма животных. Медь относится к биогенным микроэлементам наряду с железом, марганцем, селеном, цинком, кобальтом и йодом.

В организме животных медь находится в связанном с белками состоянии. Ряд окислительных ферментов, катализирующих прямое окисление атмосферным кислородом и участвующих в процессах тканевого дыхания, содержит медь в качестве кофактора. Медьсодержащие ферменты играют важную роль в окислительно-восстановительных процессах, катализируя отдельные этапы тканевого дыхания. Медь необходима для обеспечения процессов кроветворения, кератинизации и пигментации. Достаточное количество марганца, кобальта и меди должны присутствовать в рационе скота для нормального роста и развития организма, так как они стимулируют биосинтез белков крови и мышц. Также медь стимулирует биосинтез жира молока и обогащение молока казеином. Данный микроэлемент необходим для нормального развития микрофлоры преджелудка животных. Медь необходима для всасывания пищевого железа, превращения его в органически связанную форму и тем самым для синтеза гемоглобина.

При недостатке меди у животных нарушается синтез гемоглобина, следствием чего является развитие гипохромной анемии. При этом прогрессирует кислородная недостаточность, в организме накапливаются недоокисленные продукты (ацидоз). У животных появляются расстройства пищеварения, извращается аппетит, снижается продуктивность, наблюдается задержка роста молодых особей. Недостаток меди влияет на биосинтез кальциферола и на кератинизацию (задерживается переход сульфгидрильных групп в дисульфидные), что и является причиной остеодинтрофий и изменений шерстного покрова.

Введение в рацион животных кормовых добавок, содержащих медь, позволяет устранить симптомы недостаточности данного элемента [1].

Для обеспечения безопасности также необходимо контролировать содержание токсичных элементов в кормовой добавке. Появление элементных примесей может быть обусловлено такими источниками, как металлические катализаторы и металлсодержащие реактивы, используемые в процессе производства, производственное оборудование и трубопроводы, вода, упаковочные материалы для нерасфасованной продукции, окружающая среда, чистящие средства.

В настоящее время для элементного анализа используются такие методы, как атомная абсорбционная спектроскопия с электротермической ионизацией (ЭТААС), атомно-абсорбционная спектроскопия с пламенной ионизацией (ПААС), масс-спектрометрия с индуктивно связанной плаз-

мой (ИСП-МС), атомно-эмиссионная оптическая спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ИСП-ОЭС). Сравнительная характеристика данных методов анализа приведена в таблице 1.

Таблица 1 - Сравнение ИСП-МС, ИСП-ОЭС и атомной адсорбции (с пламенной и электротермической ионизацией)

Показатели	ИСП-МС	ИСП-ОЭС	ПААС	ЭТААС
Предел обнаружения	Отлично	Хорошо	Отлично	Хорошо
Производительность	Высокая	Высокая	Низкая	Средняя
Линейный диапазон	10 ³	10 ³	10 ²	10 ³
Точность	1-3%	0,3-2%	1-5%	0,1-1%
Спектральные помехи	Мало	Средний уровень	Очень мало	Отсутствуют
Химические помехи	Средний уровень	Мало	Много	Много
Ионизация	Минимальная	Минимальная	Минимальная	Низкая
Влияние массы	Высокое на низких	Нет	Нет	Нет
Количество взвеси твердого	0,1–0,4%	2–25%	Up to 20%	0,5–3%
Количество определяемых элементов	75	73	50	68
Расход раствора образца	Низкий	Средний	Очень низкий	Высокий
Полуколичественный анализ	Да	Да	Нет	Нет
Изотопный анализ	Да	Нет	Нет	Нет
Разработка метода	Сложно	Средне	Средне	Просто
Стоимость эксплуатации	Высоко	Высоко	Средне	Низко
Стоимость приобретения	Очень высоко	Высоко	Средне	Низко

Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой сегодня является одним из наиболее универсальных методов анализа элементного состава различных объектов исследований. ИСП-МС чрезвычайно быстрый (скорость измерения одной пробы при многоэлементном анализе составляет 1-2 минуты), селективный и высокочувствительный метод. Позволяет проводить количественный анализ большого набора (до 75) элементов одновременно и в широком диапазоне концентраций (от нг/кг до десятков процентов). Благодаря высокой стабильности источника ионизации (индуктивно связанная плазма) и высокой степени ионизации в нем атомов большинства элементов [2], ИСП-МС также позволяет проводить измерение изотопных соотношений в разнообразных объектах анализа с точностью до 0,2%. Такая точность позволяет проводить идентификацию происхождения той или иной продукции. ИСП-МС показал себя как высокопроизводительный метод с незначительным потреблением реагентов и низким количеством отходов [3-5].

ИСП-МС и метод подготовки проб (минерализация) с использованием микроволнового разложения в автоклавах под давлением обеспечивают хорошую чувствительность и минимальную элементную интерференцию и требуют минимального количества образца [6]. Пределы обнаружения на уровне ниже мкг/кг позволяют аналитику использовать менее концентрированные растворы образцов. Это устраняет необходимость в использовании больших объемов образцов и минимизирует потенциальное влияние компонентов образца на результат.

В настоящее время прослеживается тенденция включения метода ИСП-МС в Общие статьи ведущих фармакопей мира. Кроме того, в связи с достижениями в области подготовки проб можно ожидать дальнейшего развития использования ИСП-МС в фармацевтическом анализе [6].

До недавнего времени контроль содержания элементных примесей состоял из калориметрических реакций, представляющих собой соосаждение десяти сульфидообразующих элементов и визуальное цветовое сравнение с эталонным раствором, содержащим 10 мг/л Pb. В этом случае исследуемый образец соответствует требованиям фармакопейной статьи, если его цвет не интенсивнее эталонного раствора. Данный тест имеет определенные недостатки. Полученная информация является полуколичественной, таким методом можно проконтролировать только те элементы, которые образуют окрашенные осадки-сульфиды. Кроме того, невозможно определить, какие именно элементы выпали в осадок, следовательно, невозможно определить, какими конкретно элементами загрязнен исследуемый образец. Метод длительный и трудоемкий и требует подготовки твердых образцов с озолением при температуре 600°C, что приводит к потере летучих элементов. Еще в 1995 г. Блейк (Blake) отметил важную проблему существующей процедуры — потерю металлов. «Из-за потери металлов во время сжигания валидность результатов тестирования, полученных с использованием существующих процедур USP, JP и EP, является сомнительной». В настоящее время этот метод также используется многими фармакопеями мира (в том числе и ГФ РБ), только с небольшими изменениями (например, применяют тиацетамид, а не сероводород в качестве источника сульфид-ионов).

Люэн и др. также сравнили результаты выделения элементных примесей, полученные в ходе колориметрического теста <231> USP «Heavy Metals Analysis» и ИСП-МС. Они обнаружили, что при

колориметрическом методе процент восстановления Se, Sn, Sb, Ru и Hg значительно ниже 10% и что Hg при этом не определяется из-за ее высокой летучести. Ag оказалось единственным элементом, для которого степень восстановления превысила 50% [7].

ИСП-МС включили в фармакопейные методы контроля качества лекарственных средств в 2013 году. Это сравнительно недавно, поэтому метод не очень широко применяется в фармацевтическом анализе. Также это обусловлено высокой стоимостью оборудования и высокой квалификации специалистов.

Цель исследования. Разработка методики определения Cu, As, Cd, Pb, Hg в оригинальной кормовой добавке «Купрум-актив» методом ИСП-МС.

Исследование выполнено в рамках договора с ООО «Бионорм» по разработке методик стандартизации и контроля качества ветеринарных препаратов.

Материалы и методы исследований. Инструменты. Установка для очистки воды Millipore direct Q3 UV. Масс-спектрометр с индуктивно связанной плазмой Varian 810-MS. Рабочие условия масс-спектрометра показаны в таблице 2. Микроволновая печь Mars 5, оборудованная емкостями из ПТФЭ.

Таблица 2 - Рабочие условия ИСП-МС (Varian 810-MS)

Параметры	Значение
Плазмообразующий поток Ar, л/мин	9.0
Вспомогательный поток Ar, л/мин	1.70
Дополнительный поток Ar, л/мин	0.30
Распыляющий газ, л/мин	1.00
Количество сканирований за повтор	10
Количество повторов в измерении	5
Внутренние стандарты	Li ₆ , Sc ₄₅ , Y ₈₉ , In ₁₁₅ , Tb ₁₅₉ , Bi ₂₀₉
Изотопы определяемых элементов	Cu ₆₅ , As ₇₅ , Hg ₈₀ , Cd ₁₁₁ , Pb ₂₀₈

Реагенты и материалы. Раствор концентрированной азотной кислоты, дважды перегнанной. Деионизированная вода. Внутренний стандарт Inorganic ventures-ICPMS-71D с концентрацией элементов Li₆, Sc, Y, In, Tb, Bi 10 мг/л. Раствор Inorganic ventures-ICPMS-71A с концентрацией 10 мг/л. Стандартный образец состава SRM 1577C. Колбы мерные пластиковые на 50 мл. Центрифужные пробирки пластиковые на 50 мл.

Пробоподготовка. Около 100 мг (точная навеска) исследуемого образца помещали в тefлоновые автоклавы, добавляли концентрированную азотную кислоту, подвергали микроволновому разложению в закрытых сосудах под давлением в микроволновой системе Mars 5. Минерализацию проводили при температуре 200,0 °C в течение 10 минут. Минерализат количественно переносили в пластиковую мерную колбу на 50 мл, доводили до метки деионизированной водой. 50,0 мкл полученного раствора переносили в пластиковую мерную колбу на 50 мл, прибавляли 100 мкл внутреннего стандарта (Inorganic ventures-ICPMS-71D) и доводили до метки деионизированной водой.

Анализ проводили на масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой Varian 810-MS. Градуировку проводили методом внешнего стандарта по 5 точкам, с вычетом раствора бланка и с коррекцией супрессии по внутренним стандартам.

Содержание элементов рассчитывали с помощью программного обеспечения масс-спектрометра MS-Expert. Градуировочные растворы готовили в соответствии с таблицей 3. Пример градуировочного графика представлен на рисунке 1.

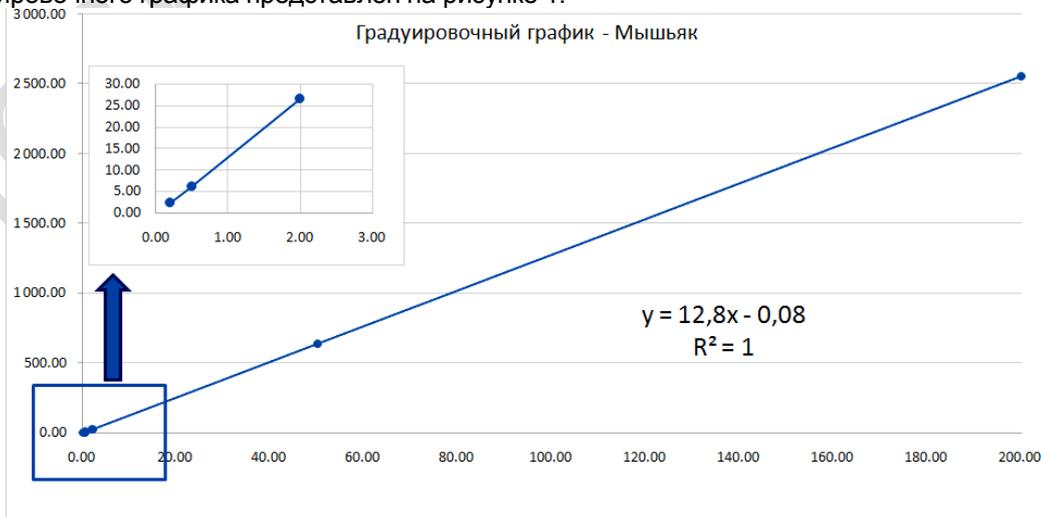


Рисунок 1 – Пример градуировочного графика на мышьяк

Таблица 3 - Схема приготовления градуировочных растворов

Тип градуировочного раствора	Концентрация, мкг/л	Исходный раствор	Концентрация исходного раствора, мкг/л	Аликвота, мл	Внутренний стандарт, мкл (IV-ICPMS-71D)	HNO ₃ , мл
Grd 1	0,2	прмж	100	0,025	100	2,3
Grd 2	0,5	прмж	100	0,1	100	2,3
Grd 3	2	прмж	100	1	99	2,3
Grd 4	50	IV-ICPMS-71A	10000	0,25	100	2,3
Grd 5	200	IV-ICPMS-71A	10000	1	100	2,3
Промежуточный раствор	100	IV-ICPMS-71A	10000	0,5	-	2,3

Результаты исследований. Концентрацию элементов Cu, As, Cd, Pb, Hg в исследуемом образце определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмы. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4 - Концентрации элементов в исследуемом образце

Элемент	Теоретическое значение	Полученное значение
Cu	10,0%	4,66%
As	10,0 мг/кг	8,1 мг/кг
Cd	5,0 мг/кг	0,2 мг/кг
Pb	15,0 мг/кг	4,4 мг/кг
Hg	0,2 мг/кг	3893,2 мг/кг

Правильность метода была подтверждена результатами измерений стандартного образца состава SRM 1577C. Полученные значения относительно аттестованных лежат в диапазоне от 95 до 105%. Результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5 - Концентрации элементов в стандартном образце состава SRM 1577C

Элемент	Сертифицированное значение, мкг/кг	Полученное значение, мкг/кг	% восстановления
Cu	275,2±4,6 *10 ³	269,27*10 ³	97,9
As	19,6±1,4	20,19	103,0
Cd	97±1,4	102,98	106,2
Pb	62,8±1,0	65,63	104,5
Hg	5,36±0,17	5,77	107,6

Заключение. Предложенная методика позволяет проводить идентификацию элементов и количественное определение меди, мышьяка, свинца, кадмия и ртути с высокой достоверностью и экспрессностью в кормовой добавке «Купрум-актив» и может быть использована для контроля качества и изучения стабильности.

Литература: 1. Гуревич, К. Г. Патолофизиологические аспекты нарушения обмена микроэлементов / К. Г. Гуревич. - Москва: МГМСУ, 2001. - 471 с. 2. Руководство пользователя Aurora M90 ICP-MS / Компания Bruker Chemical and Applied Markets // 2011. - 198с. 3. Flores, E. M. M. Microwave-assisted sample preparation for trace element determination / E.M.M Flores. - Amsterdam: Elsevier, 2014. - 416 p. 4. Mester, Z. Sample preparation for trace element analysis / Z. Mester, R. Sturgeon. - Amsterdam: Elsevier, 2003. - 304 p. 5. Mester, Z. Trends in sample preparation. / Z. Mester, R. Sturgeon. - New York: Nova, 2007. - 1338 p. 6. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review / J. S. Barin [et al.] // Analytical and Bioanalytical Chemistry. - 2016. - V. 408, № 17. - P. 408-428. 7. Lewen, N. The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals / N. Lewen // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. - 2011. V. 55, № 4. P. 653-661.

Статья передана в печать 17.10.2018 г.